

急性马兜铃酸I中毒小鼠肾小管上皮细胞损伤变化

兰爱琳^{1,2}, 王一凡^{1,2}, 李小芬^{1,2,3}, 黄春华^{1,2,3}, 楼迪栋^{1,2,3*}

¹贵州中医药大学基础医学院法医学教研室, 贵州 贵阳

²贵州省法医中药毒理学特色重点实验室, 贵州 贵阳

³贵州中医药大学司法鉴定所, 贵州 贵阳

收稿日期: 2024年3月27日; 录用日期: 2024年4月21日; 发布日期: 2024年4月28日

摘要

为连续观察急性马兜铃酸I (Aristolochic Acids I, AAI)中毒时小鼠肾脏病理学改变, 本实验将40只KM小鼠分为5组: 对照组、AAI暴露2、4、6、8天组, AAI组小鼠以5 mg/kg/2d AAI灌胃模拟急性马兜铃酸肾病(Aristolochic Acid Nephropathy, AAN), 使各组小鼠AAI累积剂量分别为5、10、15、20 mg/kg。分别于AAI暴露2、4、6、8天处死, 检测其肾功能指标肌酐(Creatinine, Cre)和尿素氮(Blood Urea Nitrogen, BUN), 并观察肾脏病理学改变。结果显示, 与对照组相比, AAI各组小鼠Cre和BUN均呈剂量依赖性上升, Cre于第6、8天具有显著性差异($P < 0.05$); BUN于第4、6、8天具有显著性差异($P < 0.05$)。AAI组小鼠主要病理变化为肾小管上皮细胞顶端微绒毛脱落、细胞水肿、坏死脱落。本研究发现暴露于AAI的小鼠肾小管损伤程度与AAI累积剂量呈正相关。

关键词

马兜铃酸I, 马兜铃酸肾病, 肾小管上皮细胞, 损伤

Changes in Renal Tubular Epithelial Cell Injury in Mice with Acute Aristolochic Acid I Intoxication

Ailin Lan^{1,2}, Yifan Wang^{1,2}, Xiaofen Li^{1,2,3}, Chunhua Huang^{1,2,3}, Didong Lou^{1,2,3*}

¹Department of Forensic Medicine, School of Basic Science, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

²Guizhou Provincial Key Laboratory of Forensic Medicine Toxicology, Guiyang Guizhou

³Forensic Institute, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

*通讯作者。

文章引用: 兰爱琳, 王一凡, 李小芬, 黄春华, 楼迪栋. 急性马兜铃酸 I 中毒小鼠肾小管上皮细胞损伤变化[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 2236-2241. DOI: 10.12677/acm.2024.1441287

Abstract

In order to continuously observe the renal pathological changes in mice during acute aristolochic acids I (AAI) intoxication, 40 KM mice were divided into 5 groups: control group, AAI exposed for 2, 4, 6, and 8 days, and mice in the AAI group were simulated with acute aristolochic acid nephropathy (AAN) by gavage of 5 mg/kg/2d AAI, and the cumulative dose of AAI in each group was 5, 10, 15, and 20 mg/kg, respectively. Mice in the AAI group were put to death on 2, 4, 6, and 8 days of exposure to AAI to test their renal function indexes of creatinine (Cre) and blood urea nitrogen (BUN) and to observe the renal pathological changes. The results showed that compared with the control group, Cre and BUN increased in a dose-dependent manner in the AAI group, with significant differences in Cre on days 6 and 8 ($P < 0.05$) and BUN on days 4, 6 and 8 ($P < 0.05$). The main pathological changes in the AAI group were detachment of microvilli from the tips of renal tubular epithelial cells, cellular edema, and necrotic detachment. In this study, we found that the degree of renal tubular injury in mice exposed to AAI was positively correlated with the cumulative dose of AAI.

Keywords

Aristolochic Acid I, Aristolochic Acid Nephropathy, Renal Tubular Epithelial Cells, Injury

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

含马兜铃酸(Aristolochic Acids, AAs)的植物如广防己、青木香、天仙藤、马兜铃、寻骨风、朱砂莲等,在自然界中分布广泛,在世界许多地区作为草药使用了几个世纪[1]。含 AAs 的植物经炮制解毒后具有止咳平喘、祛风止痛和清热活血等作用[2],如赖珊等人研究中利用仿生炮制法使具有祛风利尿、清热解毒、止痛之效的青木香“减毒存效”[3]。AAs 还可用于抗肿瘤、抗微生物感染、镇痛、血压调节、增强免疫功能等[4] [5] [6]。然而,肾毒性使 AAs 备受世界“瞩目”。其中,AAI 是最常见的 AAs 化合物,也是其主要毒性成分[7]。因此,本研究选用 AAI 作为 AAN 的造模药物,分别于 AAI 暴露后 2、4、6、8 天观察 AAI 中毒小鼠生化指标、肾脏病理学变化,探索 AAN 小鼠肾功能变化和肾脏组织病理学特征,为阐明 AAI 肾脏损伤的病理过程和不同时期的 AAN 治疗侧重点提供了实验室数据。

2. 材料和方法

2.1. 动物和主要试剂、设备

无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级雄性 KM 小鼠(斯贝福生物技术有限公司) 40 只,8 周龄,合格证号: NO. 110324230102468973,体重 28~32 g,在贵州中医药大学基础医学院实验动物中心饲养,常温环境,自由摄食、饮水。实验过程严格按照《实验动物福利伦理审查指南(GB/T358922018)》要求执行。

苏木素伊红染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。电子天平(JE203Max)购自上海浦春计量仪器有限公司；组织包埋盒(REF31050102W)购自江苏世泰实验器材有限公司；石蜡包埋机(EG1150H)、组织切片机(RM2265)、摊片机(HI1210)、光学显微镜(DM750)均购于德国 LEICA；冷冻台(KD-BL)购于浙江省金华市科迪仪器设备有限公司。

2.2. 动物处理

将 KM 小鼠置于笼中适应性喂养 3 d, 自由进食、水。将适应性喂养后的 40 只小鼠随机分为五组($n = 8$), 分别为对照组、AAI 灌胃 2 d、4 d、6 d、8 d 组[8]。对照组每两天灌胃 0.2 mL 0.4% CMC-Na; AAI 组按照 AAI 5 mg/kg/2d 灌胃给药, 分别于 2 天、4 天、6 天、8 天处死[8]。

2.3. 样本采集

灌胃前后称量体重, 用戊巴比妥(Pentobarbitone, CAS No. 76-74-4)腹腔注射麻醉后, 摘眼球取血于 EP 管后, 脱颈处死, 取双侧肾组织生理盐水冲洗, 称量重量, 采集肾脏指数数据后, 沿矢状面一分为二装入组织包埋盒浸于 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde, CAS No. 30525-89-4)中 4℃ 固定 24 h。

2.4. 肾功能检测

将小鼠血液采集于 EP 管中, 14,000 g、4℃ 离心 10 min, 取上清, 用贝克曼全自动生化分析仪检测其 Cre、BUN。

2.5. HE

肾组织 4% 多聚甲醛固定过夜后, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡后包埋、切片。脱蜡复水, 进行 HE 染色, 中性树脂封片后显微镜下观察并拍照。

2.6. 统计学分析

使用 SPSS26.0 软件对所有数据进行正态性检验, GraphPad Prism 8 绘图。符合正态性分布数据使用 t 检验, 偏态分布数据用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

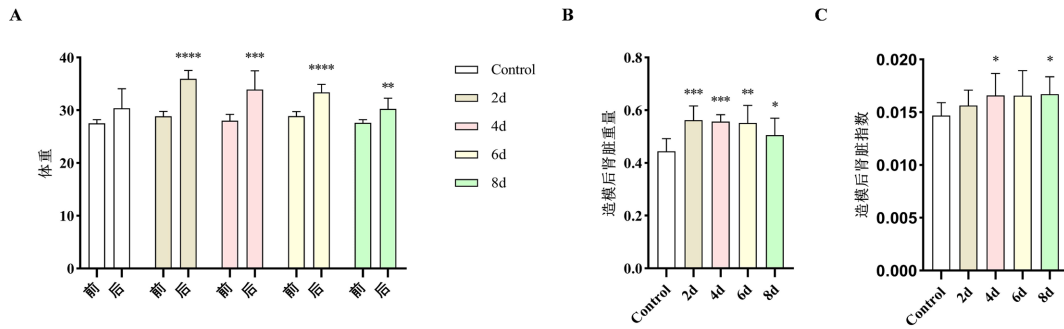
3.1. AAI 灌胃对小鼠体重、肾重量及肾指数的影响

根据前期预实验及文献查阅, 本实验选择 5 mg/kg/2d AAI 进行小鼠 AAN 模型的构建。

对比 AAI 暴露前后小鼠体重(图 1(A)), 造模前各组小鼠体重相似; 造模后, 与对照组相比, 初始(2 d)增加, 随后(4 d, 6 d, 8 d)下降(P 均 < 0.05) (图 1(B))。与对照组相比, AAI 处理后小鼠肾脏重量造模后初始(2 d)增加, 随后(4 d, 6 d, 8 d)下降(P 均 < 0.05)。经计算、统计其肾脏器重量与体重之比, 结果显示: 暴露于 AAI 后, 肾脏器指数均高于对照组, 并呈上升趋势(图 1(C)), 在 4 d、8 d 具有显著性差异(P 均 < 0.05)。

3.2. AAI 灌胃对小鼠肾功能的影响

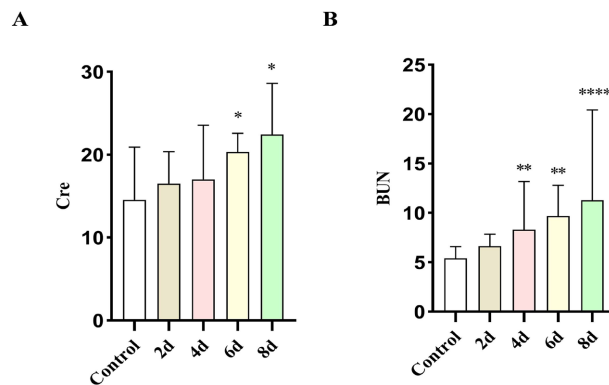
检测暴露于 AAI 后小鼠的肾功能指标(图 2), 结果显示: AAI 处理后的小鼠, Cre 均高于对照组小鼠(图 2(A)), 总体呈上升趋势; 与对照组相比, 在小鼠暴露于 AAI 的第 6 天、第 8 天具有显著性差异($P < 0.05$); 同时, AAI 处理后的小鼠, BUN 均高于对照组小鼠(图 2(B)), 总体呈上升趋势, 与 Cre 变化趋势相符; 与对照组相比, 在小鼠暴露于 AAI 第 4 天、6 天、8 天时 Cre 具有显著性差异(P 均 < 0.05)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.001$.

Figure 1. Body weight, kidney weight and kidney index of mice in each group

图1. 各组小鼠体重、肾重量及肾指数



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$.

Figure 2. Changes in creatinine and urea nitrogen in various groups of mice

图2. 各组小鼠肌酐和尿素氮变化

3.3. 急性 AAN 肾脏的病理学改变

对 AAI 处理后的小鼠肾脏组织进行 HE 染色(图 3)。结果显示：AAI 组小鼠肾小管损伤程度与 AAI 暴露累积剂量呈正相关。与对照组相比，AAI 处理 2 d 后(图 3(B))，肾小管上皮细胞顶端微绒毛脱落(红色箭头)；4 d 时(图 3(C))肾小管上皮细胞胞质肿胀(蓝色箭头)；6 d 时(图 3(D))肾小管管腔扩张，管腔内可见片状坏死脱落的上皮细胞(☆)；8 d 时(图 3(E))肾小管出现基底膜裸露(绿色箭头)，并见到管腔内红色均染的蛋白尿(*)。

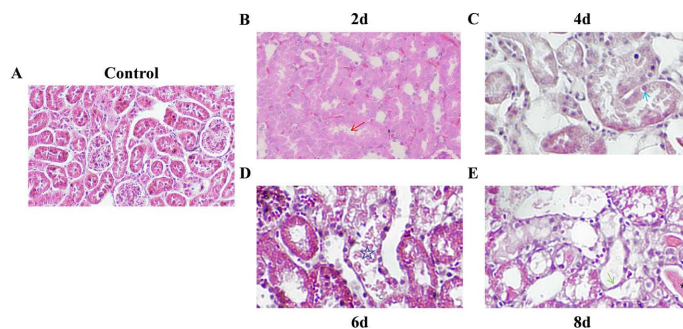


Figure 3. HE staining of kidney tissues from various groups in mice

图3. 各组小鼠肾组织 HE 染色

4. 讨论

AAN 是一种药物性肾病,可能导致急性肾损伤(Acute Kidney Injury, AKI),并与肾纤维化和尿路上皮细胞癌的进展过程相关[9]。AAI 是造成 AAN 的主要原因,是一种含量最丰富、毒性最强的 AAs,也是体内最具代表性的可引起严重肾病的成分[7] [10]。毒性成分在硝基还原酶(Nitroreductase, NTR)的催化下,一部分还原为毒性代谢产物马兜铃内酰胺(Aristololactam),另一部分在还原过程中进一步形成 DNA 加合物,导致 DNA 损伤[11]。

我们通过暴露于 AAI 后的小鼠观察其肾毒性作用。暴露于 AAI 后的小鼠体重、肾重、肾脏指数均稍高于对照组,但体重、肾重随暴露时间增加均呈下降趋势,肾脏指数呈上升趋势,表示 AAI 暴露后使小鼠体重稍增、肾脏稍有变大,可能与 AAI 损伤肾脏后肾脏水肿有关。由于肾病患者常出现液体过负荷(Fluid Overload, FO),是 AKI 的普遍并发症[12],考虑 AAI 影响小鼠肾脏水液代谢从而影响其重量指标。临床常用 Cre 和 BUN 水平评估肾脏功能,Cre 和 BUN 需要经由肾脏代谢排出[13],暴露于小鼠体内 Cre 和 BUN 水平升高可能是由于 AAI 中毒引起急性肾功能下降,导致滤过重吸收功能受损,Cre 和 BUN 代谢障碍。

在 AAI 导致的 AAN 过程中,其病理改变主要表现为近端小管损伤[14],因此我们在小鼠暴露于 AAI 后第 2、4、6、和 8 天连续观察了 AAN 的肾小管病理学改变。结果显示,AAN 以近端小管受损为主,近端小管上皮细胞损伤与 AAI 暴露时间呈正相关。OAT4 表达于近端小管细胞的顶端表面,作用于小管重吸收过程并促进外源性药物排泄,我们推测 AAI 可能与近端小管顶端特异性表达的定位于刷状缘参与 AAI 转运的 OAT4 相互作用,从而引起该部位的特异性损伤[15]。

AAI 暴露后,首先表现为近端小管刷状缘受损,上皮细胞顶膜微绒毛脱落;随后近端小管上皮细胞水肿;逐渐发展为肾小管管腔扩张,近端小管上皮细胞坏死、脱落直至基底膜裸露,出现蛋白尿,说明肾小管上皮细胞脱落后,造成重吸收功能严重受损。对比肾功能指标改变和肾脏病理变化的时间点,我们发现,肾脏在 AAI 暴露后第 2 天开始出现形态结构改变,肾功能指标到第 4 天、第 6 天时才出现显著升高,提示我们在 2 到 4 天时,肾脏可能还处于代偿状态,肾脏损伤可能还是可逆阶段。因此在临床上可以通过肾功能指标变化的情况预估肾小管上皮细胞受损程度,从而调整治疗方案。

综上所述,本实验结果显示,暴露于 AAI 的小鼠肾小管损伤程度与 AAI 暴露累积剂量呈正相关,本研究可为临床治疗 AAN 提供理论依据及治疗思路参考,但后期还需要进行更多实验及临床研究。

参考文献

- [1] Xu, T., Chen, W., Zhou, J., *et al.* (2021) Computational Analysis of Naturally Occurring Aristolochic Acid Analogues and Their Biological Sources. *Biomolecules*, **11**, 1344. <https://doi.org/10.3390/biom11091344>
- [2] 何曼文, 郭海嘉, 黎芷君, 等. HPLC 法对鱼腥草中马兜铃酸 A 的定性分析[J]. 山东化工, 2022, 51(24): 111-113.
- [3] 赖珊, 李茵芳, 袁干军, 等. 青木香的仿生炮制减毒研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7): 1647-1650.
- [4] 文星星, 张朝辉, 刘可钦, 等. 含马兜铃酸中药的减毒存效研究进展[J]. 工业微生物, 2023, 53(5): 68-70.
- [5] 王婉丽, 樊馨, 杨亚彬, 等. 倒心盾翅藤抗炎活性部位对马兜铃酸肾病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中成药, 2023, 45(10): 3442-3446.
- [6] Zhang, H.M., Zhao, X.H., Sun, Z.H., *et al.* (2019) Recognition of the Toxicity of Aristolochic Acid. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **44**, 157-162. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12789>
- [7] Dong, Y.P., Chen, S.Z., He, H.S., *et al.* (2023) Skullcapflavone II, a Novel NQO1 Inhibitor, Alleviates Aristolochic Acid I-Induced Liver and Kidney Injury in Mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, **44**, 1429-1441. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01052-3>
- [8] 王一凡, 刘爽, 汪思齐, 等. 急性马兜铃酸中毒小鼠肾损伤及 Wnt7b/ β -catenin/MMP-7 的表达变化[J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(6): 505-511.

-
- [9] Ji, H., Hu, J., Zhang, G., *et al.* (2021) Aristolochic Acid Nephropathy: A Scientometric Analysis of Literature Published from 1971 to 2019. *Medicine*, **100**, e26510. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026510>
- [10] Feng, C., Anger, E.E., Zhang, X., *et al.* (2022) Protective Effects of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 against Aristolochic Acid I-Induced Toxicity in HK-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 3674. <https://doi.org/10.3390/ijms23073674>
- [11] Jiang, Z., Bao, Q., Sun, L., *et al.* (2013) Possible Role of mtDNA Depletion and Respiratory Chain Defects in Aristolochic Acid I-Induced Acute Nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **266**, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.008>
- [12] Wald, R., Kirkham, B., Dacosta, B.R., *et al.* (2022) Fluid Balance and Renal Replacement Therapy Initiation Strategy: A Secondary Analysis of the STARRT-AKI Trial. *Critical Care (London, England)*, **26**, Article No. 360. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04229-0>
- [13] Bohn, M.K., Higgins, V. and Adeli, K. (2020) CALIPER Paediatric Reference Intervals for the Urea Creatinine Ratio in Healthy Children & Adolescents. *Clinical Biochemistry*, **76**, 31-34. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.12.001>
- [14] Liu, X., Wu, J., Wang, J., *et al.* (2020) Mitochondrial Dysfunction Is Involved in Aristolochic Acid I-Induced Apoptosis in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Human & Experimental Toxicology*, **39**, 673-682. <https://doi.org/10.1177/0960327119897099>
- [15] Li, X.W., Yokota, S., Wang, D., *et al.* (2014) Localization of Aristolochic Acid in Mouse Kidney Tissues by Immunohistochemistry Using an Anti-AA-I and AA-II Monoclonal Antibody. *The American Journal of Chinese Medicine*, **42**, 1453-1469. <https://doi.org/10.1142/S0192415X14500918>